

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-051065

(43)Date of publication of application : 28.02.1995

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
G01N 33/50
// C07K 14/00
C12P 21/02

(21)Application number : 04-035085

(71)Applicant : NIPPON KOUTAI KENKYUSHO:KK
KAGOSHIMA UNIV

(22)Date of filing : 21.02.1992

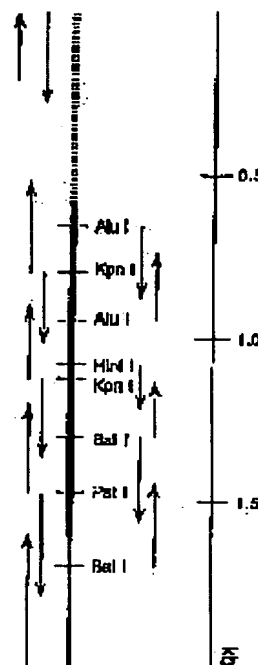
(72)Inventor : MASUZAWA YASUSHI
MURAMATSU TAKASHI
MIYAUCHI TERUO

(54) GLYCOPROTEIN 39 GENE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a new gene useful for the production of a human-originated mucin glycoprotein 39 useful as a tumor marker, immune abnormality marker and marker for various inflammatory diseases.

CONSTITUTION: This glycoprotein 39 gene is cDNA clone pKP39 coding glycoprotein 39 and having restriction map and a base-sequence determination method shown in the drawing. The glycoprotein 39 gene can be produced by separating whole RNA from a cell expressing glycoprotein 39 (e.g. gastric cancer cell strain KATO-III), purifying mRNA therefrom, synthesizing cDNA by conventional method, constructing a library by integrating into an expression vector and selecting a clone having glycoprotein 39 gene by using an anti-glycoprotein 39 antibody.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.11.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3023469

[Date of registration] 21.01.2000

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-51065

(43) 公開日 平成7年(1995)2月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09				
G 0 1 N 33/50	T	7055-2 J		
// C 0 7 K 14/00		8318-4 H		
C 1 2 P 21/02	C	9282-4 B		
		9050-4 B		
			C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数 3	O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平4-35085

(22) 出願日 平成4年(1992)2月21日

特許法第30条第1項適用申請有り・平成3年8月25日、
社団法人日本生化学会発行の「生化学 Vol. 63, N
o. 8, 1991」に発表

(71) 出願人 000153258

株式会社日本抗体研究所
群馬県高崎市西横手町351番地1

(71) 出願人 391012523

鹿児島大学長
鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号

(72) 発明者 増沢 寧

埼玉県川口市西川口2丁目14-6

(72) 発明者 村松 喬

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘3丁目26-9

(72) 発明者 宮内 照雄

鹿児島県鹿児島市宇宿町689 USKビル
202

(74) 代理人 弁理士 有賀 三幸 (外2名)

(54) 【発明の名称】 糖タンパク質39遺伝子

(57) 【要約】

【構成】 配列表で示されるアミノ酸配列を含有し、配
列表で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含
有するヒト由来の糖タンパク質39遺伝子。

【効果】 本発明糖タンパク質39遺伝子を用いれば、
糖タンパク質39のコアタンパク質を容易にかつ大量に
製造することができる。本発明の糖タンパク質39は、
ヒト癌組織、特に胃癌、大腸癌、肝癌、肝癌、食道癌、
肺癌などに発現が認められる一方、胃、結腸、肺など分
泌性正常組織に発現していることより、腫瘍マーカー、
免疫異常マーカーあるいは各種炎症性疾患マーカーとし
ての応用が期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖タンパク質39遺伝子。

【請求項2】 配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列と配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列とを含有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 配列番号1で示される5'末端側部分の塩基配列と配列番号2で示される3'末端側部分の塩基配列とを含有する請求項1記載の遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規なムチン糖タンパク質39遺伝子に関し、更に詳細には腫瘍マーカー、免疫異常マーカーあるいは各種炎症性疾患マーカーとして有用なヒト由来のムチン糖タンパク質39のコアタンパク質をコードする塩基配列を含有する遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】一般に癌化した細胞の細胞膜には正常な細胞とは異なる糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質が存在することが知られている。またガンを診断するに際し、癌患者において特異的に産生されるタンパク抗原や糖鎖抗原を測定する方法が行なわれている。その例としては、癌胎児抗原(CEA)、 α -フェトプロテイン、CA19-9などの測定による消化器系癌の診断等が知られている〔村松喬、日本臨床、44、p.337-344(1986)；神奈木玲児、臨床病理、35、p.1247-1264(1986)；医学のあゆみ、106巻、5号、第5土曜特集、235~250頁(1978年)〕。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来の各種癌抗原測定を利用するガンの診断法は適用できる癌の種類が比較的限られていたり、健康人や肝炎等の他疾患との交差反応がおこるなどの問題点があり、より広範な種類の癌に適用できる診断法又は特異性の高い診断法が望まれている。また、種々の免疫異常応答に基づく疾病や各種炎症性疾患においても適確な診断法が望まれている。そして、かかる疾患の診断に利用出来る腫瘍マーカー、免疫異常マーカーあるいは各種炎症性疾患マーカーとなり得る新たな糖タンパク質及びそのコアタンパク質をコードする遺伝子の開発が切望されている。

【0004】一方、近年、各種癌組織等において発現しているムチンの糖鎖およびコアタンパク質の構造解析が進展し、癌をはじめとする各種疾患との関連性が注目されてきている〔Bhavanandan, V. P., Glycobiology, 1, 493-503(1991)〕。

【0005】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者らは、上記課題を解決する目的でヒト胃癌細胞表面に発現する糖タンパク質に着目して研究をしてきたところ、腫瘍、免疫異常あるいは各種炎症性疾患の診断への応用が期待さ

れる新規ムチン糖タンパク質39のコアタンパク質をコードする遺伝子を見出し、これが乳癌や脾癌において見出されたポリモルフィック エピセリアル ムチン(P EM)と高いホモロジーを示すが、明らかに異なる新しいムチンであることを明らかにし、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明はヒト由来の新規ムチンのコアタンパク質をコードする糖タンパク質39遺伝子を提供するものである。

【0007】本発明遺伝子は、例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列と配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、これらのアミノ酸配列に相補的な塩基配列、又はそれらの両者を含有するものである。なお、配列表において、塩基配列の下段は上段の塩基配列より推定されるアミノ酸配列である。

【0008】本発明の糖タンパク質39遺伝子は、例えば以下のようにして調製される。すなわち、まず糖タンパク質39を発現している細胞より全RNAを分離し、これよりmRNAを精製し、常法によりcDNAを合成したのちこれを発現ベクターに組込んだライブラリーを構築する。次いで抗糖タンパク質39抗体を用いてこのcDNAライブラリーより糖タンパク質39遺伝子を有するクローンを選択し、本発明の糖タンパク質39遺伝子を得る。次に上記本発明遺伝子の製法につき、詳細に説明する。

【0009】〔1〕cDNAライブラリーの構築

全RNAの抽出に用いられる組織細胞としてはヒト胃癌組織又は既にセルラインとして確立された細胞株、例えば胃癌細胞株KATO-III〔Sekiguchi M., Sakakibara K. and Fujii G. (1978). Jpn. J. Exp. Med., 48, p.61-68〕が挙げられる。

【0010】RNAの抽出は、グアニジン-イソチオシアネート混合液又は適当な界面活性剤、例えばSDS、NP-40、トリトンX-100、デオキシコール酸等を用いて、或いはホモジナイザーを用いる方法や凍結融解等の物理的方法によって、細胞を部分的又は完全に破壊、可溶化した後、染色体DNAを、ポリトロン等のミキサーもしくは注射筒を用い、ある程度せん断し、その後、蛋白質と核酸分画とを分別する操作により行なわれる。この操作には、特にフェノール・クロロホルム抽出もしくは超遠心を用いるCsCl重層法〔Chirgwin, J. M., et al., Biochemistry, 18, p.5294(1979)〕等が一般に用いられる。

【0011】また上記各方法においては、RNaseによるRNAの分解を防ぐために、RNaseインヒビター、例えばヘパリン、ポリビニル硫酸、ジエチルピロカーボネート、バナジウム複合体、ペントナイト、マカロイド等を添加しておくのがよい。

【0012】上記抽出操作に従って得られるRNAからのmRNAの分離、精製は、抽出物を例えばオリゴdT-セルロース(Colaborative Research Inc.)、ポリU-セファロース(ファルマシア社)等の吸着カラムを用いる方法

により又はパッチ法により実施できる。

【0013】上記により得られる精製mRNAは、通常不安定であり、安定な相補DNA(cDNA)の型に代えられ、目的遺伝子の増幅を可能とするために微生物由来のベクターに接続される。インビトロでの、上記mRNAのcDNAへの変換、即ちcDNAの合成は、一般に次のようにして行なうことができる。

【0014】即ち、まずオリゴdTをプライマーとし(このプライマーは遊離のオリゴdTもしくは既にベクタープライマーに付加されたオリゴdTのいずれでもよい)、mRNAを鋳型としてdNTP(dATP, dGTP, dCTP又はdTTP)の存在下で、逆転写酵素を用いてmRNAに相補的な一本鎖cDNAを合成する。次のステップは、上記において遊離のオリゴdTを用いたか、ベクタープライマーに付加されたオリゴdTを用いたかにより、各々以下の如く異なる。

【0015】前者の場合、鋳型としたmRNAをアルカリ処理等により分解して除去し、その後一本鎖DNAを鋳型として逆転写酵素又はDNAポリメラーゼを用いて二本鎖DNAを作成する。次に得られる二本鎖DNAの両端をエキソヌクレアーゼで処理し、そのそれぞれに適当なリンカーDNA又はアニーリング可能な組合せの塩基を複数付加し、これを適当なベクターへ組込む。これは使用するベクターに応じ公知の方法、例えばヤングらの方法[Young, R. A. et al., in "DNA Cloning, Vol. 1", p.49(1985)]、あるいはグブラーとホフマンの方法[Gubler, U. and Hoffman, B. J. Gene, 25, p.263(1983)]などを使用して行われる。また、上記cDNAの合成には市販のcDNA合成キットを用いれば容易に行うことができる。

【0016】ベクターは、特に制限はされないが、λgt系のファージベクターやプラスミドベクター等を宿主に応じて適当に選択し、あるいは組合せて使用できる。ここで用いられるベクターとしてはλgt10、λgt11等を例示でき、λgt10、λgt11をベクターとして用いる方法は前記ヤングらの方法に準じて行うことができる。

【0017】λgt系のファージベクターに組込んだcDNA組換え体はインビトロパッケージング液と反応させることによりcDNA組換え体ファージとなり、λgt10又はλgt11のcDNAライブラリーが構築される。上記のλgt系ファージライブラリーの作成は市販のλgt10又はλgt11 cDNAクローニングキットを用いれば容易に行うことができる。

【0018】また、後者の場合、鋳型としてmRNAを残存させたまま、上記と同様のリンカーを付加した開環状プラスミドと、リンカーDNA(しばしば動物細胞で自立複製できる領域とmRNAの転写プロモーター領域を含むDNA断片が用い得る)とを、アニーリングさせて閉環状とした後、dNTP存在下で、RNaseとDNAポリメラーゼを共存させてmRNAをDNA鎖に置換し、完全なプラスミドDNAを作成できる。

【0019】上記の如くして得られるcDNA組換え体プラスミドを宿主微生物に導入し、該微生物を形質転換する。宿主微生物としては、大腸菌(*Escherichia coli*)が代表的であるが、特にこれに限定されず、その他に枯草菌(*Bacillus subtilis*)、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)等も使用することができる。

【0020】DNAの宿主微生物への導入及びこれによる形質転換の方法としては、一般に用いられている方法、例えば主として対数増殖期にある細胞を集め、CaCl₂処理して自然にDNAを取り込みやすい状態にして、プラスミドを取り込ませる方法等を採用できる。上記方法においては、通常知られているように形質転換の効率を一層向上させるためにMgCl₂やRbClを更に共存させることもできる。また、微生物細胞をスフェロプラスト又はプロトプラスト化してから形質転換させる方法も採用することができる。

【0021】〔2〕糖タンパク質39遺伝子クローンの選択

上記により得られる形質転換株から、本発明糖タンパク質39のコアタンパク質をコードするcDNAを含有する株を選出する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

【0022】(1) 本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のコアタンパク質に対する抗体を用いて選出する方法

予め、cDNAを形質転換株内でタンパク質を発現し得るベクターに組込み、形質転換株内でタンパク質を産生させ、本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のコアタンパク質に対する抗体及び該抗体に対する第2抗体を用いて、本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のポリペプチド産生株を検出し、目的株を得る。

【0023】(2) 動物細胞で本発明糖タンパク質39のポリペプチドを産生させてスクリーニングする方法
形質転換株を培養し、遺伝子を増殖させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし(この場合、自己複製可能でmRNA転写プロモーター領域を含むプラスミド若しくは動物細胞染色体にインテグレートするようなプラスミドのいずれでもよい)、遺伝子にコードされたタンパク質を産生させ、本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のコアタンパク質に対する抗体を用いて本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のポリペプチドを検出することにより、元の形質転換株より目的の本発明糖タンパク質39のポリペプチド部分をコードするcDNAを有する株を選出する。

【0024】(3) セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法
形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にブロットし、本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のポリペプチド産生細胞から

のmRNAをハイブリダイゼーションさせた後、cDNAに対応するmRNAを回収する。回収されたmRNAを蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白質に翻訳させ、本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のコアタンパク質に対する抗体を用いて検出して、目的の株を得る。

【0025】なお、上記方法において用いられる本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質のコアタンパク質に対する抗体は、公知の方法により作成することができる。

【0026】即ち、まず本発明糖タンパク質39を発現している組織細胞の細胞膜を界面活性剤を用いて可溶化し、これを糖タンパク質39が結合しうるレクチン結合アガロースカラムに吸着させて、レクチン結合糖タンパク質を調製する。

【0027】各種組織細胞の細胞膜可溶化画分離手段としては、例えばヒト癌組織、ヒト細胞を適当な緩衝液中で破砕後、100,000×gの高速遠心分離に付し、その残渣をトリトン系界面活性剤に溶解し、これを再度100,000×gの高速遠心分離に付し、その上清を採取する方法が挙げられる。

【0028】得られた細胞膜可溶化画より本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質を分離するために用いられるレクチンとしては、例えばピーナッツ豆レクチン (Peanut agglutinin, PNA) が挙げられ、かかるレクチンは市販されているものを用いてもよいし、例えばピーナッツ豆より自体公知の手段により抽出分離したものを用いてもよい。レクチン結合アガロースは市販されているものを用いてもよいし、通常的手段によりアガロースゲルにカップリングさせて得ることもできる。

【0029】レクチン結合糖タンパク質の溶出には、ハブテン糖、例えばラクトース溶液等が用いられる。ここで用いる溶出液の濃度は0.05~0.2Mが好ましい。

【0030】次に、本発明糖タンパク質39を含むレクチン結合糖タンパク質をトリフルオロメタンスルホン酸 (TFMS) またはフッ化水素で処理して糖鎖を除去した後、これを完全アジュバントと共にウサギ等の小動物に免疫し、さらに適当な間隔をおいて数回不完全アジュバントと共に免疫した後抗血清を採取する。次に大腸菌を熱処理し遠心分離して得られる菌体成分と前述で得られた抗血清とを4℃にて混和した後、遠心分離すれば求めるポリクローナル抗体を得ることができる。

【0031】上記において得られた本発明遺伝子クローンは、常法に従って各種プラスミドにサブクローニングすることができる。例えばEcoRIにて切断して精製した本発明遺伝子を含むcDNA断片を、同様にEcoRIにて切断したpUC18 [Yanisch-Perron, C., et al., Gene, 83, p.103-119(1985)] などのクローニングベクターの切

断部位へ挿入すればよい。これにより所望の組換え体プラスミドを得ることができる。また得られる組換え体プラスミドの宿主への導入及びこれによる組換え体プラスミドの増幅と個別化は、一般に用いられている各種の方法、例えば主として対数増殖期にある細胞を集め、CaCl₂処理により自然にDNAを取り込みやすい状態とし、これをにベクターを取り込ませる方法等により行い得る。

【0032】なお、上記において採用される各種の操作、例えば一部DNAの化学合成、DNA鎖の切断、削除、付加ないし結合を目的とする酵素処理、DNAの単離、精製、複製、選択等はいずれも常法に従うことができる。より具体的には、上記DNAの単離精製は、アガロースゲル電気泳動等により行うことができる。

【0033】また、上記で得られる本発明遺伝子の塩基配列の決定は、適当な制限酵素でDNAを消化した後、ジデオキシ法 [Sanger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p.5463(1977)] やマキシム-ギルバート法 [A. M. Maxam and W. Gilbert, Methods in Enzymology, 65, p.499(1980)] 等により行い得る。更に上記塩基配列の決定は、市販のシーケンスキット等を用いることによっても容易に行い得る。

【0034】かくして得られた本発明糖タンパク質39遺伝子の塩基配列の一部及び対応するアミノ酸配列を配列番号1及び配列番号2に示す。塩基の番号は5'末端を1とし、5'末端から3'末端方向につけられている。アミノ酸残基の番号はN末端からC末端方向へつけられており、最初にコードされるアミノ酸を1としている。配列番号1は配列を決定できた糖タンパク質39遺伝子の翻訳領域のうち、最も5'末端に位置する180塩基の長さの翻訳領域で、60個のアミノ酸のタンパク質部分に相当する。この配列はPNA遺伝子と類似の60塩基(20アミノ酸残基)を1単位とするくり返し配列(tandem repeats)領域と考えられ、くり返し数には個体差があると思われる。また、配列番号2に示される糖タンパク質39遺伝子の翻訳領域は981塩基の長さで、327個のアミノ酸のタンパク質部分に相当する。配列番号1の配列は塩基配列で3'側(アミノ酸配列でC末端側)にさらにくり返し配列がつながり、これに配列番号2が接続する。

【0035】得られた本発明遺伝子の利用によれば、従来公知の一般的な遺伝子組換え技術により [Science, 224, p.1431(1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, p.692(1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, p.5990(1983); EP特許公開第187991号公報等参照]、糖タンパク質39のコアタンパク質を容易に且つ大量に製造、取得することができる。また、このようにして得られる糖タンパク質39のコアタンパク質を用い、糖タンパク質39のコアタンパク質に特異的な抗体を作成することができる。抗体は通常のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の製造法に従い製造されるが、糖タン

バク質39のコアタンパク質複合体に対するポリクローナル抗体からワインバーガー(Weinberger)らの方法〔Science, 228, p.740-742(1985)〕に従いエпитープ特異的抗体を得ることも可能である。抗体は糖タンパク質39及びそのコアタンパク質の精製、測定、識別等に用いられる。

【0036】また、上記の如くして得られる糖タンパク質39のコアタンパク質には、配列表に示すアミノ酸配列のN末端にメチオニンが結合したポリペプチド、及び上記アミノ酸配列のN末端に糖タンパク質39のためのシグナルペプチドの部分もしくは全部が結合、又は欠損した中間体も包含される。かかる変異は天然に、例えば翻訳後の修飾により得られ、あるいは遺伝子工学的的手法においては、天然から得た遺伝子を例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス等の方法により改変したり、ホスファイトトリエステル法等の化学合成法により変異したDNAを合成したり、或いは両者を組合せて、遺伝子を合成できる。これらの遺伝子を利用し、これを微生物のベクターに組込み、形質転換された微生物から産生させることにより、変異を有するコンポーネントを得ることができる。又、これらのタンパク質は、その機能を保ったまま、天然或いは人口の変異により、その一部のアミノ酸の置換や配列の改変を行うことができる。従って、本発明の糖タンパク質39遺伝子は、上記の各種変異を有する蛋白質をコードする遺伝子も包含する。遺伝暗号の末端にはTAG、TAA等の終止コドンが付加することができる。遺伝暗号は上記配列番号1及び2に例示されたコドンに限られず、アミノ酸配列を変えることなく各アミノ酸に対し任意のコドンを選択でき、例えば遺伝子組換えに利用する宿主のコドン使用頻度等を考慮した常法に従えばよい〔Nuc1. Acids. Res., 9, p.43-74(1981)〕。

【0037】

【発明の効果】本発明糖タンパク質39遺伝子を用いれば糖タンパク質39のコアタンパク質を容易に且つ大量に製造することができる。本発明の糖タンパク質39は、ヒト癌組織、特に胃癌、大腸癌、肝癌、食道癌、肺癌などに発現が認められる一方、胃、結腸、肺など分泌性正常組織に発現していることより、腫瘍マーカー、免疫異常マーカーあるいは各種炎症性疾患マーカーとしての応用が期待される。

【0038】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

【0039】実施例1

本発明糖タンパク質39の調製：胃癌細胞KATO-III 2gを氷冷下CaCl₂およびMgCl₂添加PBS〔PBS(+)〕中で細断し、これをPotter-Elvehjem型のホモジナイザーにてホモジナイズした。

【0040】この破砕液を4℃にて1時間高速遠心(10

5,000×g)し、その上清を除去したペレットに2%トリトンX-100、0.15M NaCl、0.01M トリス-HCl (pH7.6)及び50μg/mlのプロテアーゼ阻害剤であるPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)(シグマ社)を含む溶液60mlを加え、さらにこれをホモジナイズしたのち4℃にて30分放置し、細胞膜を可溶化した。これを4℃にて1時間高速遠心(105,000×g)し、該上清を得た。

【0041】該上清を市販のPNA結合アガロースカラム(E.Y. ラボラトリーズ社製)に添加し、PNA結合糖タンパク質を吸着させた。

【0042】該カラムを0.1%トリトンX-100、0.15M NaCl及び0.01M トリス-HClを含む洗浄液(pH7.6)200mlにて洗浄した。その後PNA結合糖タンパク質を0.05M ラクトース溶液50mlにて溶出させた。

【0043】溶出液中のPNA結合糖タンパク質のタンパク濃度はローリー法にて測定し、総量で3mg(タンパク含量)のPNA結合糖タンパク質を得た。

【0044】実施例2

(1) PNA結合糖タンパク質の糖鎖除去：PNA結合糖タンパク質2mgを凍結乾燥後、トリフルオロメタンスルホン酸(TFMS)-アニソール(2:1)溶液1mlを加えて溶解した。反応液中に窒素ガスを通気して置換したのち25℃で5時間攪拌し、糖鎖を分解した。反応終了後、2倍量のジエチルエーテルを加えて混和したのち、-80℃に1時間放置した。次に氷冷した50%ピリジン溶液を等量加えてボルテックスミキサーで攪拌し、次いでエーテル層を除去した。さらにエーテルを加えて同様にエーテル抽出を2回行ったのち、2mMピリジン-酢酸バッファー(pH 5.5)4lに対して、透析した。

【0045】(2) PNA結合糖タンパク質のコアタンパク質に対するポリクローナル抗体の作成：(1)で調製した糖鎖除去PNA結合糖タンパク質のPBS(-)溶液(タンパク質濃度800μg/ml)0.5mlとフロインドの完全アジュバント0.5mlを混和して調製した懸濁液をニュージーランドホワイト種の雄ウサギの足趾に皮下接種した。その後2週間おきに3回、上記フロインドの不完全アジュバントとPNA結合糖タンパク質の懸濁液を足趾又は背に皮下接種して免疫した。最終免疫後10日目にウサギの耳静脈より採血し、完全に凝血させた後4℃で20分間高速遠心(150,000rpm)を2回くり返して上清を回収し、抗血清を得た。

【0046】(3) 抗体の吸収処理：後記実施例3(2)で示す、本発明糖タンパク質39のコアタンパク質をコードする組換え体ファージクローン分離のためのスクリーニングに用いる抗体は、大腸菌菌体成分と交差反応しないことが望まれる。そこで、予めスクリーニングに用いる抗体を大腸菌(E. coli Y1090)菌体成分と反応させ、これと交差する抗体を除去した。

【0047】E. coli Y1090株をLB培地〔Molecular Cloning (A Laboratory Manual); T.Maniasis, E. F. Fr

itsch, J. Sambrook; Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p.68] 500ml 中で37°Cにて一夜培養し、5000rpm、10分間の遠心で菌体を集めた。これを20mlの蒸留水に懸濁して100°Cで5~10分間加熱処理した。更に、10,000rpmで10分間遠心したのち上清を分離した。次に、実施例2(2)で作成した抗血清をPBS(-)で50倍希釈した溶液100mlに、この上清1mlを加えて混和し、4°Cで2時間放置したのち、10,000rpmで15分間遠心し、その上清を分離して本発明糖タンパク質39のコアタンパク質に対する抗体を得た。

【0048】実施例3

(1) 胃癌細胞株KATO-IIIのcDNAライブラリー作成：胃癌細胞株KATO-IIIを、RPMI-1640培地に10%の割合で牛胎仔血清を加えた培地で5%のCO₂ガス通気下37°Cにて継代培養した。得られた胃癌細胞株KATO-IIIからグアニジウムイソチオシアネート法〔Molecular Cloning (A Laboratory Manual); T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook; Cold Spring Harbor Laboratory (1982), p.196〕に従って全RNA 3mgを抽出し、これをオリゴ(dT)セルロースカラム(Colaborative Research Inc., カラム容量1ml)を用いてポリ(A)⁺RNA 200μgを得た。以下アマシャム社のcDNA合成システムのプロトコルに従い、2本鎖のcDNAを合成した。即ち、該当ポリ(A)⁺RNA 5μgに逆転写酵素(アマシャム社)を作用させて第一DNA鎖を合成した。次に大腸菌リボヌクレアーゼH(RNase H)及び大腸菌DNAポリメラーゼI(共にアマシャム社)を作用させ、RNAを消化しながら第一DNA鎖を鋳型として第二DNA鎖を合成し、T4DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性を利用して平滑末端を有する二本鎖cDNA(ds-cDNA)を合成した。

【0049】上記により得られたds-cDNAをさらにアマシャム社のcDNA・クローニングシステムλgt11を使って発現ベクターλgt11にクローニングした。即ちds-cDNAにEcoRIメチラーゼ(アマシャム社)を作用させ、ds-cDNAの内部にある制限酵素EcoRIの認識部位をメチル基により保護し、次にT4DNAリガーゼ(アマシャム社)により合成EcoRIリンカー(アマシャム社)を両末端に接続し、最後にこれに制限酵素EcoRI(アマシャム社)を作用させて両端を付着末端とした。

【0050】このds-cDNAとλgt11アーム(アマシャム社)をT4DNAリガーゼ(アマシャム社)により結合させ、組換えDNAを作成した。これにインビトロバックティング液(アマシャム社)を作用させてcDNAライブラリーを作成した。

【0051】(2) 本発明糖タンパク質39をコードする組換え体ファージクローンの分離：(1)で得られたλgt11cDNAライブラリーとE. coli Y1090を37°Cにて20分間インキュベートし、組換え体ファージを宿主菌であるY1090に吸着させた後、溶解した上層軟寒天と混合して寒天平板上にまきひろげた。上層寒天固化後寒天平板を42°C

で4~8時間培養し、ブラークを形成させた。次いで10mMイソプロピル-β-D-ガラクトシド(IPTG)で飽和させ、乾燥させたニトロセルロースフィルターを寒天平板表面に置き37°Cにて2時間インキュベートして、β-ガラクトシダーゼ融合タンパク質を発現させた。

【0052】その後これを4°Cにて1時間以上冷却した後フィルターをはがした。このフィルターを室温で1時間ブロッキング溶液(2%馬ヘモグロビン、0.1% Tween20, PBS(-))に浸した後、該ブロッキング溶液中で実施例2(3)で吸収処理した本発明糖タンパク質39のコアタンパク質に対する抗体50μg/mlと反応させ、室温にて2時間インキュベートさせた。該フィルターを0.1% Tween20を含むPBS(-)で5回洗浄後、このフィルターをホースラディッシュパーオキシダーゼ(HRP)標識抗ウサギIgG抗体(Cappel社製)ブロッキング溶液(200倍希釈液)中で室温にて2時間反応させ、該反応終了後、上記の洗浄液で5回洗浄した。次いで過酸化水素含有4-クロロ-1-ナフトール溶液で発色させて本発明糖タンパク質39のコアタンパク質に対応する融合タンパク質を発現しているクローンを選択した。得られたクローンの単一ブラークを分離した後、Y1090を宿主として増殖させSM緩衝液中に懸濁させて4°Cで保存した。該クローンをλKP39と命名した。

【0053】(3) 本発明糖タンパク質39をコードする組換え体ファージの溶原菌作成：Huynh, T. V., Young, R. A., Davis, R. W.: DNA Cloning Vol.1 A Practical Approach, (ed.) Glover, D. M., IRL Press(1985) p.49-78記載の方法に従ってλKP39をE. coli BNN103に溶原化させた溶原菌を作成した。

【0054】(4) 本発明糖タンパク質39をコードする組換え体ファージDNAの分離：(2)で得られた本発明糖タンパク質39をコードする組換え体ファージクローン(λKP39)をE. coli Y1090を宿主として増殖させたのち、〔Molecular Cloning (A Laboratory Manual); T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook; Cold Spring Harbor Laboratory (1982) p.371-372〕記載の方法に従って、本発明組換え体ファージDNA(λKP39 DNA)を調製した。

【0055】(5) プラスミドpKP39形質転換株の作成：λKP39 DNAを制限酵素EcoRI(日本ジーン社製)で消化し、約1900塩基対のDNA断片を得た。

【0056】一方、プラスミドベクターpBluescript IISKS(ストラタジーン社製)を同じくEcoRIで消化したのち、両断片をT4DNAリガーゼ(宝酒造社製)で結合させ、本発明糖タンパク質39のポリペプチド鎖をコードする組換え体プラスミドpKP39を得た。

【0057】得られた組換え体プラスミドpKP39をE. coli JM83のコンピテント細胞に形質導入した。

【0058】(6) 制限酵素地図の作成：(5)で得られたpKP39を〔Molecular Cloning (A Laboratory Manual);

T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook; Cold Spring Harbor Laboratory (1982)p.104-106] に記載の方法に従って処理し、さら上記文献p.374-p.381の方法に従って、本発明糖タンパク質39をコードするpKP39 クロンの制限酵素地図を作成した(図1)。

【0059】(7) pKP39 クロンの塩基配列決定: pKP39 クロンの塩基配列の決定はサンガー (Sanger) らの方法 [Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p.5463-5467(1977)] に従って行なった。

【0060】以上の結果より得られた糖タンパク質39遺伝子の配列は、翻訳領域及び3'側の非翻訳領域を含めて全体で約1900個の塩基からなる。このうち、5'末端より約600塩基は60塩基を1単位とするくり返し配列領域である。この領域を含めて翻訳領域は約1560塩基の長さで、約553個のアミノ酸のタンパク質部分をコードすることが判明した。しかし、くり返し配列領域の配列は、180塩基(60アミノ酸残基をコードし得る)を決定できた(配列番号1)が、その他のくり返し配列は未決定である。くり返し配列より下線の1320塩基の配列は決定し、配列番号2に示した。

【0061】実施例4

(1) 全RNA及びポリ(A)*RNAの調製

実施例3-(1)に示したグアニジウムイソチオシアネート法に従って胃癌細胞株KATO-IIIより全RNAを抽出し、また市販のオリゴ(dT)セルロースカラム(Colaborative Research Inc.)を用いてポリ(A)*RNAを調製した(前記Molecular Cloning p.196-198 参照)。

【0062】(2) ノーザンブロッティング

(1)で調製した全RNA20μg又はポリ(A)*RNA10μgを前記Molecular Cloning (p.200~201)の方法に従って、グリオキサール存在下、50℃にて1時間加熱して変性させた後、10mMリン酸ナトリウム溶液を含む1%アガロースゲルにて90Vで3~4時間電気泳動を行なった。次に分離したRNAを20×SSC中でニトロセルロースフィルター(シュライアーアンドシェル社)へ15時間かけて転写させた。RNA転写後のニトロセルロースフィルターを室温で乾燥後80℃で2時間ベーキングして固定し、その後20mMトリス塩酸バッファー(pH 8.0)中、100℃にて5分間加熱してグリオキサールを除去した。このフィルターを実施例3-(7)に記したブレハイブリダイゼーション溶液中で42℃にて3時間振とうした後、α-³²P-dCTP標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液(組成はプローブ以外ブレハイブリダイゼーション溶液と同じ)中*

*に移して42℃にて20時間振とうした。プローブはpKP39クロン中cDNAを制限酵素EcoRIで切断した断片をマルチプライムDNAラベリングシステム(アマシャム社)を用いてα-³²P-dCTPにて標識したものを0.5~1×10⁷cpm/mlの濃度で使用した。ハイブリダイゼーション終了後、フィルターを2×SSC-0.1%SDS溶液に移して室温で10分間ずつ3回洗浄し、更に0.1×SSC-0.1%SDS溶液中で60℃にて30分間ずつ3回洗浄した後室温で乾燥した。フィルターをろ紙にはりつけてX線フィルムカセットに入れ、X線フィルム(コニカ社XAR-5)を重ねて-70℃で1~3日間感光させた。

【0063】得られたノーザンブロッティングの結果を図2に示す。

【0064】なお、RNAの分子量マーカーとして28S及び18SリボソームRNAを用いた。その結果、4400塩基長及び6800塩基長の二本のmRNAが検出された。これは既知のPEM mRNAと同様にオルターナティブスプライシングにより生じたものと考えられる。

【0065】

20 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 180

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: ホモサピエンス

細胞の種類: 胃印環細胞癌

セルライン: KATO-III

直接の起源

ライブラリー名: λgt11 KATO-III cDNA library

クローン名: λKP39

配列の特徴

特徴を表す記号: mat peptide

存在位置: 1..180

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: repeat region

存在位置: 1..180

40 特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: repeat unit

存在位置: 1..60

特徴を決定した方法: S

配列

GGC TCC ACC GCC CCC CCA GCC CAC GGT GTC ACC TCG GCC CCG GAG AGC	48
Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Glu Ser	
1 5 10 15	
AGG CCG GCC CCG GCC TCC ACC GCG CCC GCA GCC CAC GGT GTC ACC TCG	96
Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Ala Ala His Gly Val Thr Ser	

13	20	25	30	14
CCC CCG GAG AGC AGG CCG GCC CCG GGC TCC ACC GCG CCC GCA GCC CAC				144
Ala Pro Glu Ser Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Ala Ala His				
35	40	45		
GGT GTC ACC TCG GCC CCG GAC ACC AGG CCG GCC CCG				180
Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro				
50	55	60		

【0066】配列番号: 2

* クローン名: λ KP39

配列の長さ: 1320

配列の特徴

配列の型: 核酸

10 特徴を表す記号: mat peptide

鎖の数: 二本鎖

存在位置: 1..981

トポロジー: 直鎖状

特徴を決定した方法: S

配列の種類: cDNA to mRNA

特徴を表す記号: polyA signal

起源

存在位置: 1267..1272

生物名: ホモサピエンス

特徴を決定した方法: S

細胞の種類: 胃印環細胞癌

特徴を表す記号: polyA site

セルライン: KATO-III

存在位置: 1293..1320

直接の起源

特徴を決定した方法: S

ライブラリー名: λ gt11 KATO-III cDNA library *

配列

GGC TCC ACC GCC CCC CCA GCC CAC GGT GTC ACC TCG GCC CCG GAC ACC	48
Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr	
5 10 15	
AGG CCC GCC TTG GGC TCC ACC GCG CCT CCA GTC CAC AAT GTC ACC TCG	96
Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser	
20 25 30	
GCC TCA GCC TCT GCA TCA GGC TCA GCT TCT ACT CTG GTG CAC AAC GGC	144
Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly	
35 40 45	
ACC TCT GCC AGG GCT ACC ACA ACC CCA GCC AGC AAG AGC ACT CCA TTC	192
Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe	
50 55 60	
TCA ATT CCC AGC CAC CAC TCT GAT ACT CCT ACC ACC CTT GCC AGC CAT	240
Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His	
65 70 75 80	
AGC ACC AAG ACT GAT GCC AGT AGC ACT CAC CAT AGC ACG GTA CCT CCT	288
Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Thr Val Pro Pro	
85 90 95	
CTC ACC TCC TCC AAT CAC AGC ACT TCT CCC CAG TTG TCT ACT GCG GTC	336
Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val	
100 105 110	
TCT TTC TTT TTC CTG TCT TTT CAC ATT TCA AAC CTC CAG TTT AAT TCC	384
Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser	
115 120 125	
TCT CTG GAA GAT CCC AGC ACC GAC TAC TAC CAA GAG CTG CAG AGA GAC	432
Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp	
130 135 140	
ATT TCT GAA ATG TTT TTG CAG ATT TAT AAA CAA GCG GGT TTT CTG GCG	480
Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly	
145 150 155 160	

15	CTC TCC AAT ATT AAG TTC AGG CCA GGA TCT GTG GTG GTA CAA TTG ACT	16	528
	Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr		
165	170	175	
	CTG GCC TTC CGA GAA GGT ACC ATC AAT GTC CAC GAC GTG GAG ACA CAG		576
	Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln		
180	185	190	
	TTC AAT CAG TAT AAA ACG GAA GCA GCC TCT CGA TAT AAC CTG ACG ATC		624
	Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile		
195	200	205	
	TCA GAC GTC AGC GTG AGT GAT GTG CCA TTT CCT TTC TCT GCC CAG TCT		672
	Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser		
210	215	220	
	GGG GCT GGG GTG CCA GGC TGG GGC ATC GCG CTG CTG GTG CTG GTC TGT		720
	Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys		
225	230	235	240
	GTT CTG GTT GCG CTG GCC ATT GTC TAT CTC ATT GCC TTG GCT GTC TGT		768
	Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys		
245	250	255	
	CAG TGC CCG CGA AAG AAC TAC GGG CAG CTG GAC ATC TTT CCA GCC CGG		816
	Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg		
260	265	270	
	GAT ACC TAC CAT CCT ATG AGC GAG TAC CCC ACC TAC CAC ACC CAT GGG		864
	Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly		
275	280	285	
	CGC TAT GTG CCC CCT AGC AGT ACC GAT CGT AGC CCC TAT GAG AAG GTT		912
	Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val		
290	295	300	
	TCT GCA GGT AAT GGT GGC AGC AGC CTC TCT TAC ACA AAC CCA GCA GTG		960
	Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val		
305	310	315	320
	GCA GCC ACT TCT GCC AAC TTG TAGGGGCACG TGGCCCGCTG AGCTGAGTGG		1011
	Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu		
325	327		
	CCAGCCAGTG CCATTCCACT CCACTCAGGT TCITCAGGGC CAGAGCCCTT GCACCTGT		1071
	TGGGCTGGTG AGCTGGGAGT TCAGGTGGGC TGCTCACACC GTCTTCAGA GGCCCCACCA		1131
	ATTTCCTCGA CACTTCTCAG TGTGTGGAAG CTCATGTGGG CCCCTGAGGC TCATGCCTGG		1191
	GAAGTGTTGT GGTGGGGGCT CCCAGGAGGA CTGGCCGAGA GAGCCCTCAG ATAGCGGGGA		1251
	TCCTGAACTG GACTGAATAA AACGTGCTCT CCCACTGGCG CAAAAAAAAA AAAAAAAAAA		1311
	AAAAAAAAA		1320

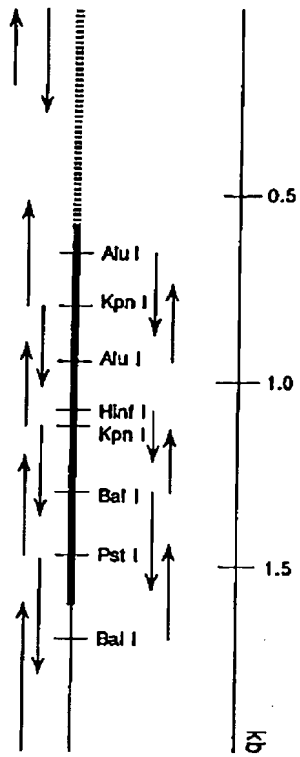
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明糖タンパク質39のコアタンパク質をコードするcDNAの制限酵素地図及び塩基配列決定方法を示す。図1中、最上段に示したスケールは、cDNAの1番目の塩基を基準にしたヌクレオチドの長さ（キロベース）である。その下段は本発明糖タンパク質39をコードするcDNAクローンpKP39を示している。該線上左側の破線

40 部分は20アミノ酸残基を1単位とするくり返し配列をコードする領域を、中央の太い黒線部分はそれにひき続くコーディング領域を示す。矢印は各DNA断片について決定した塩基配列の方向と長さを示す。

【図2】実施例4における本発明タンパク質をコードするmRNAのノーザンブロッティングを示す図面である。4400塩基長及び6800塩基長の2本のmRNAが存在する。

【図1】



【図2】

